

## REMARKS

Claims 1 and 6 have been amended. Thus, Claims 1, 2 and 5-7 remain pending in the present application. No new matter has been added. Reconsideration and withdrawal of the present rejections in view of the comments presented herein are respectfully requested.

Claims 1, 2 and 5-7 were rejected as allegedly being unpatentable over Zeyuan et al. (*J. Agric. Food Chem.*, 46:3875-3878, 1998) and Xia (CN1435125; Derwent Acc No 2004-023802) in view of Suzuki et al. (*J. Agric. Food Chem.*, 48:5649-5653, 2000) and in further view of Iwasaki et al. (US 7,014,876). The Examiner contends that it would have been obvious to use/try any catechins, such as O-methylated catechin derivative EGCG3'Me of Suzuki et al. obtained from black or oolong teas in the method of reducing blood triglyceride levels of Zeyuan et al. and Xia, and that it would have been obvious to use the amount recited in present claim 1 in view of Iwasaki et al. However, as explained below, this combination of references would not render the present invention obvious.

The Examiner noted in the Office Action at page 3, item 4, that neither Zeyuan et al. nor Xia discloses the methylated catechins recited in the present claims, or the tea leaves recited in the present claims which contain these compounds. However, as discussed below, contrary to the assertions of the Examiner, the selection of the recited varieties of tea leaves is not an obvious selection.

The pending claims recite a method of reduction of triglyceride levels by administering a functional beverage (claim 1) or composition (claim 6) comprising the recited methylated catechins and derived from the recited list of tea leaves. The present invention relates, in part, to Applicants' discovery that methylated catechins are much better than the non-methylated ones at reducing triglyceride (TG) levels. Based on this discovery, they selected the varieties of tea listed in Claims 1 and 6 that have high levels of methylated catechins for use in reducing triglycerides. One having ordinary skill in the art would not know to select these particular varieties of tea because such a person would not know that teas having high levels of methylated catechins should be selected in order to reduce TG levels.

The inventors' discovery that methylated catechins are far superior in reducing triglyceride levels is further documented in their scientific publication, Oritani et al. (*Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 56(7):412-418, 2009) [Document 1]. A copy of this reference as well as an English translation of the pertinent parts is attached. Document 1 teaches that although non-methylated catechins (e.g., EGCG, EGC, ECG, ED) are found in green teas, the methylated catechin EGCG3''Me, which is one of the compounds recited in the present claims, is not found in the green tea Yabukita. This reference shows that the green tea "Benifuuki", which does contain EGCG3''Me,

has a significantly greater TG-lowering effect than "Yabukita." Thus, Document 1 further supports the criticality of the use of teas such as "Benifuuki," which have high levels of methylated catechins.

The two primary references, Zeyuan et al. and Xia, do not disclose or suggest anything about methylated catechins. In fact, the results reported in Zeyuan actually support the patentability of the claimed invention. Document 2, Maeda-Yamamoto et al. (*Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 48(1):64-68 (2001)) teaches that strongly fermented teas, such as black teas, contain low levels of EGCG''3Me, and are therefore only found in trace amounts in the black teas described therein. However, the Zeyuan reference reports a TG-lowering effect of black tea, albeit a lesser effect than that of the particular green tea studied. Based on the applicants' studies, it is believed that the effect of black teas in reducing TG levels may be due to the non-methylated catechins present therein. However, nothing in the Zeyuan reference suggests that teas having higher levels of methylated catechins should be selected.

Xia disclose that oolong tea, in combination with a number of other ingredients, can be used to lower TG levels. However, nothing in Xia suggests that green teas high in methylated catechins, including the recited tea varieties, should be selected in particular.

The secondary references add nothing that could be used to lead one having ordinary skill in the art to select the recited varieties of tea in reducing triglyceride levels. Suzuki et al. disclose that a methylated catechin extract obtained from Benihomare and tong ting tea leaves that has an anti-allergy effect. However, this reference discloses nothing that such an extract has any effect on TG levels. Iwasaki et al. teaches an amount of catechin contained in oolong tea, but does not disclose anything about effective amounts of methylated catechins for reducing triglyceride levels.

Thus, the combination of the primary references with the secondary references would simply not lead one having ordinary skill in the art to select the particular recited tea varieties, which are high in methylated catechins, for reducing TG levels. In the absence of the inventors' teachings, one having ordinary skill in the art would not have any reason to select the particular varieties recited in the present claims out of all the many varieties of tea, because such a person would not know to select the varieties that have high levels of methyl catechins. It is only based on the disclosure of the present application that one of ordinary skill in the art would know to select specific varieties of tea, i.e. those with high levels of the recited methylated catechins. Thus, the claims cannot be obvious in view of the cited combination of references.

In view of the comments presented above, Applicants respectfully request reconsideration and withdrawal of the rejection under 35 U.S.C. § 103(a).

No Disclaimers or Disavowals

Although the present communication may include alterations to the application or claims, or characterizations of claim scope or referenced art, Applicant is not conceding in this application that previously pending claims are not patentable over the cited references. Rather, any alterations or characterizations are being made to facilitate expeditious prosecution of this application. Applicant reserves the right to pursue at a later date any previously pending or other broader or narrower claims that capture any subject matter supported by the present disclosure, including subject matter found to be specifically disclaimed herein or by any prior prosecution. Accordingly, reviewers of this or any parent, child or related prosecution history shall not reasonably infer that Applicant has made any disclaimers or disavowals of any subject matter supported by the present application.

CONCLUSION

Applicants submit that all claims are in condition for allowance. However, if minor matters remain, the Examiner is invited to contact the undersigned at the telephone number provided below. If any additional fees are required, please charge these to Deposit Account No. 11-1410. Should there be any questions concerning this application, the Examiner is respectfully invited to contact the undersigned at the telephone number appearing below.

Please charge any additional fees, including any fees for additional extension of time, or credit overpayment to Deposit Account No. 11-1410.

Respectfully submitted,

KNOBBE, MARTENS, OLSON & BEAR, LLP

Dated: 7/1/09

By: 

Neil S. Bartfeld, Ph.D.

Patent Agent

Registration No. 39,901

Customer No. 20,995

(619) 235-8550

## 「べにふうき」緑茶による脂肪蓄積抑制の作用機序

織谷幸太, 松井悠子, 栗田郁子, 木下洋輔, 川上晋平, 柳江高次, 西村栄作, 加藤正俊\*,  
齋 政彦<sup>§</sup>, 松本一朗\*\*, 阿部啓子\*\*, 山本(前田)万里\*\*\*, 亀井優徳

森永製菓株式会社ヘルスフードサイエンス研究所

\* 株式会社森永生科学研究所

\*\* 東京大学大学院農学生命科学研究科

\*\*\* 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所

## Mechanism of Anti-obese Effects of 'Benifuuki' Green Tea

Yukihiro Oritani, Yuko Matsui, Ikuko Kurita, Yosuke Kinoshita, Shinpei Kawakami, Koji Yanae,  
Eisaku Nishimura, Masatoshi Kato\*, Masahiko Sai<sup>§</sup>, Ichiro Matsumoto\*\*,  
Keiko Abe\*\*, Mari Maeda-Yamamoto\*\*\* and Masanori Kamei

Health Food Science Research Institute, Morinaga & Co., Ltd., 2-1-1,

Shimosueyoshi, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-8504

\* Morinaga Institute of Biological Science, INC., 2-1-16, Sachiura,

Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0003

\*\* Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University  
of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657

\*\*\* National Institute of Vegetable and Tea Science, National Agriculture and  
Food Research Organization, 2769 Kanaya, Shimada, Shizuoka 428-8501

The molecular mechanism underlying high anti-obese effects of 'benifuuki', a tea cultivar that contains unique methylated catechins such as epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl) gallate (EGCG<sup>3</sup>Me), was explored. This cultivar was then compared with 'yabukita', a popular tea cultivar that lacks these methylated catechins. (1) The comprehensive gene expression in the perirenal adipose tissue of mice (12-week-old male C57BL/6J) was examined by DNA microarray analysis, following consumption of either high-fat diets with and without the addition of 2% benifuuki or 2% yabukita leaf powder. (2) In cultured 3T3-L1 cells, EGCG, EGCG<sup>3</sup>Me and caffeine were compared for their inhibitory effects on the intracellular fat accumulation as well as on cell differentiation from precursor to mature adipocytes. (3) Time-dependent changes in EGCG and EGCG<sup>3</sup>Me plasma concentrations were examined in catheterized rats following oral administration of benifuuki extract under an overnight fasting condition. The results of the DNA microarray indicated that the anti-obese effect of benifuuki may be ascribed to the inhibition of fat accumulation in adipocytes *via* the downregulation of enzyme expression associated with both the synthesis and  $\beta$ -oxidation of fatty acids. The stronger anti-obese effects of benifuuki compared with yabukita may be attributed to the presence of its unique methylated catechins (primarily EGCG<sup>3</sup>Me), whose stability in circulation is 3.2 times higher than EGCG; however, the inhibitory activity of EGCG<sup>3</sup>Me on fat accumulation is almost the same as that of EGCG (about 91% in terms of differentiation inhibition in 3T3-L1 cells). Thus, EGCG<sup>3</sup>Me appears to fortify the overall anti-obese effects of benifuuki. That is, the inhibitory activity on fat accumulation through the combination of both EGCG and EGCG<sup>3</sup>Me was 1.7 times higher than that through EGCG alone, even though the content of EGCG<sup>3</sup>Me in benifuuki is much less than EGCG.

(Received Nov. 18, 2008 ; Accepted Feb. 4, 2009)

**Keywords:** benifuuki, methylated catechins, epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)gallate (EGCG<sup>3</sup>Me), fat accumulation, obesity  
**キーワード:** べにふうき, メチル化カテキン, エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル) ガレート (EGCG<sup>3</sup>Me), 脂肪蓄積, 肥満

〒230-8504 神奈川県横浜市鶴見区下末吉 2-1-1

\* 〒236-0003 神奈川県横浜市金沢区幸浦 2-1-16

\*\* 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

\*\*\* 〒428-8501 静岡県島田市金谷 2769

<sup>§</sup> 連絡先 (Corresponding author), m-sai-ia@morinaga.co.jp

緑茶 (*Camellia sinensis* L.) は日本や中国などで古来より飲用されてきたが, 近年では, 緑茶の主要成分である茶カテキンの多様な生理機能が注目され, 広く世界中で飲用されている。緑茶に含まれる茶カテキンには, エピガロカ

表 1 各群における体重、食餌量、臓器重量および血清生化学データ

	「べにふうき」群	「やぶきた」群	無添加群
体重増加量 (g/5 weeks)	6.00±0.67 <sup>†</sup>	7.53±0.70	8.79±0.87
総摂取カロリー (kcal/5 weeks)	556.8±13.6	575.6±17.2	568.2±20.9
肝臓 (mg)	1019.5±20.3	1019.6±32.7	1100.8±29.8
皮下脂肪 (mg)	450.1±41.1 <sup>†</sup>	556.3±50.8 <sup>†</sup>	765.7±77.7
精巣上体脂肪 (mg)	861.1±93.1 <sup>†</sup>	1035.8±114.7	1308.2±149.1
腎周囲脂肪 (mg)	273.4±35.0 <sup>†</sup>	337.6±32.0	462.2±55.1
血中総コレステロール (mg/dL)	155.8±4.8	138.9±10.2	161.8±4.9
血中中性脂肪 (mg/dL)	50.0±6.31	61.2±6.13	61.5±8.15
血糖値 (mg/dL)	220.1±7.8	240.5±7.5	250.3±10.9
血中レプチン (ng/mL)	1.56±0.34 <sup>†</sup>	3.11±0.99	5.32±1.40

平均値±標準誤差

<sup>†</sup>: 多重比較 (Tukey の方法) において無添加群と有意差 ( $p<0.05$ ) が認められた

テキングレート (EGCG), エピガロカテキン (EGC), エピカテキンレート (ECG), エピカテキン (EC) などの一群の類縁体があるが、これらの中で EGCG は含有率が最も高く、一般的に生理活性も強いことが知られている。緑茶中の茶カテキン組成は、品種、栽培条件、摘葉時期、加工条件などによって異なるが、茶品種の一つである「べにふうき」の乾燥茶葉中には、エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル) ガレート (EGCG<sup>3</sup>Me) に代表されるメチル化カテキンが 0.8~2.5% (w/w) 程度含まれている (総カテキンに占めるメチル化カテキンの割合は 15% 程度)。このメチル化カテキンは、日本国内で一般的に流通している茶品種の「やぶきた」には含まれていない<sup>1)2)</sup>。

近年、肥満が社会的問題の一つとして認知され、2008 年 4 月より特定健康診査・特定保健指導が開始されるなど、その対策に関心が寄せられている。これまでに、緑茶ならびに EGCG に代表される茶カテキンには脂肪蓄積抑制作用<sup>3)~5)</sup> やエネルギー代謝亢進作用<sup>6)</sup> などの抗肥満作用のあることが報告されているが、「べにふうき」および EGCG<sup>3</sup>Me の抗肥満効果に関する報告はない。我々は、「べにふうき」茶葉には「やぶきた」茶葉と比べて強い抗肥満効果があることを見いだした<sup>7)</sup>。本報告では、「べにふうき」の抗肥満作用メカニズムの解明を目的として、「べにふうき」茶葉および「やぶきた」茶葉を添加した高脂肪飼料ならびに無添加の高脂肪飼料を 5 週間摂取させたマウスの脂肪組織における遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析して比較するとともに、培養脂肪細胞 3T3-L1 の脂肪蓄積に及ぼす EGCG, EGCG<sup>3</sup>Me およびカフェインの影響について調べた。また、「べにふうき」エキスを経口投与したラット血液中における EGCG および EGCG<sup>3</sup>Me の滞留性についても比較した。

## 実験方法

すべての動物実験は、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 4 月 28 日環境省告示

第 88 号)」を遵守して行った。

### 1. DNA マイクロアレイ解析

12 週齢のオス C57BL/6J マウスに 2%「べにふうき」茶葉添加高脂肪飼料、2%「やぶきた」茶葉添加高脂肪飼料および無添加の高脂肪飼料を 5 週間自由摂食させ (各群  $n=10$ )、肥満関連のパラメーターを測定した結果、「べにふうき」茶葉は一般的な緑茶である「やぶきた」茶葉に比べて強い抗肥満効果を示した (表 1)。5 週間の飼育期間を経た上記 3 群のマウス (各群  $n=10$ ) から、DNA マイクロアレイ解析に使用する個体をそれぞれ 3 個体ずつ選抜した。具体的には、松井らの方法<sup>8)</sup>を参考に、10 項目の肥満関連パラメーター (体重増加量、総摂取カロリー、肝臓重量、鼠径部皮下脂肪組織重量、腎周囲脂肪組織重量、精巣周囲脂肪組織重量、血中中性脂肪濃度、血中総コレステロール濃度、血中レプチン濃度、血糖値) を指標として、各群から最も平均的な 3 個体を選抜した。各群 3 個体の腎周囲脂肪組織から Trizol (Invitrogen) および RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出し、遺伝子発現量を Affymetrix 社のマニュアルに従って Gene Chip mouse 430 2.0 array (Affymetrix) により網羅的に測定した。データ解析には GeneChip Operating Software ver.1.2 (Affymetrix) および GeneSpring GX 7.3.1 (Agilent Technology) を用いた。各群 3 個体中で 2 個体以上が Present または Marginal のフラグを示したプローブを解析対象とした。3 群間の統計解析は一元配置分散分析により行い、Benjamini と Hochberg らの方法<sup>9)</sup>で false discovery rate を算出し、 $q$  値が 0.3 以下の遺伝子についてのみ 3 群間の発現量を Tukey の方法により多重比較検定 ( $p<0.05$ ) した。

### 2. 脂肪前駆細胞における脂肪蓄積抑制

#### (1) カテキン類

EGCG およびカフェインはシグマ社から購入し、EGCG<sup>3</sup>Me は佐野らの方法<sup>10)</sup>を用いて「べにふうき」茶葉より純品を精製した。

#### (2) 脂肪前駆細胞の培養および分化誘導

マウスの脂肪前駆細胞 3T3-L1 (ATCC) は、10% (v/v) FBS を含有する Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) で培養した。3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化誘導は、Furuyashiki らの方法<sup>11)</sup> を一部改変し、以下の条件で行った。24 ウェルプレートに細胞を  $1 \times 10^5$ /ウェルの密度で播種し、2 日間培養した後、10% (v/v) FBS、0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma)、1  $\mu$ M dexamethasone (Sigma) および 0.5  $\mu$ g/mL insulin (Sigma) を含む DMEM で更に 2 日間分化誘導処理した。誘導処理後、培地を 10% (v/v) FBS および 0.5  $\mu$ g/mL insulin を含む DMEM に交換し、2~3 日毎に培地を交換しつつ、6~7 日間培養を継続した。分化誘導開始時より、培地中に異なる濃度の EGCG、EGCG3<sup>o</sup>Me あるいはカフェインを添加し、脂肪蓄積量または分化率に対する影響を以下の測定方法により評価した。

### (3) Oil Red O 染色による脂肪蓄積量の比較

Wolfram らの方法<sup>5)</sup> に従って、24 ウェルプレート上の細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄し、10% (v/v) ホルマリンで 30 分固定した後、60% (v/v) イソプロパノールに溶解した Oil Red O (Sigma) 飽和溶液に 20 分間浸漬して脂肪を染色した。染色後、細胞を PBS で 3 回洗浄して顕微鏡観察を行った後、100% イソプロパノールを添加して Oil Red O を抽出し、 $A_{546}$  を測定した。無添加における  $A_{546}$  を 100% とし、EGCG、EGCG3<sup>o</sup>Me あるいはカフェインを培地に添加した細胞の脂肪蓄積率を算出し、これらの添加物による脂肪蓄積抑制効果を比較した。有意差検定 ( $p < 0.05$ ) は Tukey の方法による多重比較を行った。

### (4) Nile Red 染色による脂肪細胞分化率の比較

Feyisola らの方法<sup>12)</sup> に従って、24 ウェルプレート上の細胞をトリプシン処理により剥離し、1% (w/v) パラホルムアルデヒドで 20 分固定した後、0.1  $\mu$ g/mL Nile Red (MP Biomedicals) で 10 分染色した。細胞中の脂肪へ取り込まれた Nile Red の蛍光を FACSCanto II (Becton Dickinson and Company) を用いて測定した。Nile Red の測定は、アルゴンレーザー (488 nm) で励起し、564~604 nm のバンドパスフィルターを通過した蛍光を検出し、Nile Red 染色された細胞を分化細胞とした。1 測定当たりの細胞数は 5000 以上とし、総細胞数に占める Nile Red 染色細胞数の割合を分化率として算出した。EGCG および EGCG3<sup>o</sup>Me の各添加濃度における分化率について、Student の t-test により有意差検定 ( $p < 0.05$ ) を行った。

### 3. EGCG および EGCG3<sup>o</sup>Me の血中滞留量の測定

#### (1) 実験動物および採血

7 週齢のオス SD ラット (日本 SLC) に前もって頸静脈カニューレーション手術を施した後、実験に使用するまでに 1 週間の回復期間を設けた。回復期間中は、温度  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 10\%$ 、明期 12 時間 (7:00-19:00) の条件下にて一

般飼料 CE-2 (日本クレア) および水道水を自由に与え、床網付きのステンレスケージ中で単独飼育した。「べにふうき」エキス (アサヒ飲料) を EGCG 濃度が 1 mM となるように 1 mM アスコルビン酸を含む 1 mM 塩酸に溶解し、試験前日より 1 晩絶食させたラットに体重 100 g 当たり 1 mL を経口投与した ( $n=7$ )。投与前および投与後 15、30、60、120、180 分の時点で、カニューレを通じて 0.5 mL ずつヘパリン加採血を行い、血漿を分離した後分析時まで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

#### (2) EGCG および EGCG3<sup>o</sup>Me の定量

血漿中の EGCG および EGCG3<sup>o</sup>Me の濃度は、Lee らの方法<sup>13)</sup> を一部改変した方法により HPLC (SCL-10Avp; 島津製作所) を用いて測定した。即ち、まず、アセトニトリルで血漿中のタンパク質を除去し、酢酸エチルにより EGCG および EGCG3<sup>o</sup>Me を抽出した。抽出液を減圧乾固した後、用いた血漿と同量の HPLC 移動相溶液に溶解し、その 20  $\mu$ L を逆相カラム (CAPCELL PAK C18 MGII,  $2.0 \times 150$  mm; 資生堂) にインジェクションした。HPLC 移動相には 100  $\mu$ M EDTA-2Na を含む 0.1% リン酸溶液: アセトニトリル = 90:10 を用い、流速 0.4 mL/min でアイソクラティック溶出した。溶出ピークの検出は電気化学検出器 (NANOSPACE SI-2; 資生堂) により行い、600 mV の印加電圧で検出された電流値の溶出パターンからピーク面積を算出し、濃度既知の標準物質のピーク面積から作成した標準直線を用いて定量した。経口投与後 3 時間までの EGCG および EGCG3<sup>o</sup>Me の血中濃度を曲線下面積 (AUC) に変換し、各時間における AUC の有意差 ( $p < 0.05$ ) を Student の t-test により検定した。

## 実験結果

### 1. 白色脂肪細胞の遺伝子発現に及ぼす「べにふうき」茶葉摂取の影響

「べにふうき」茶葉を摂取したマウス (「べにふうき」群)、「やぶきた」茶葉を摂取したマウス (「やぶきた」群) および無添加の高脂肪飼料を摂取したマウス (無添加群) の腎周囲白色脂肪における脂質代謝関連遺伝子の発現量の変動を DNA マイクロアレイにより解析して比較した (表 2)。その結果、脂肪酸合成酵素遺伝子群の発現を制御する Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 (Srebp1) 遺伝子<sup>14)</sup> の発現量が、「べにふうき」群では無添加群の 0.68 倍と減少傾向にあった ( $p < 0.10$ )。また、Srebp1 によって制御される Stearoyl-CoA desaturase 2 遺伝子<sup>15)</sup> の発現量が、「べにふうき」群で無添加群の 0.5 倍に減少していた ( $p < 0.05$ )。更に、脂肪酸の  $\beta$  酸化に関与する Acetyl-CoA acyltransferase 1A (Acaa1)<sup>16)</sup> や Acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl (Pcox)<sup>16)</sup> 遺伝子の発現量が、「べにふうき」群では無添加群に比較してそれぞれ 0.71 倍 ( $p < 0.05$ )、0.75 倍 ( $p < 0.05$ ) と有意に減少していた。

表 2 脂質合成, 代謝および脂肪細胞増殖因子についての遺伝子発現解析

	シンボル	遺伝子	プローブ#	q 値	「べにふうき」群	「やぶきた」群	無添加群
Lipid synthesis and metabolism	Scd2	Stearoyl-CoA desaturase 2	1415822_at	0.19	0.50±0.1 <sup>ab</sup>	0.91±0.0	1.00±0.2
	Acaa1	Acetyl-CoA acyltransferase 1A	1416947_s_at	0.25	0.71±0.1 <sup>a</sup>	0.86±0.0	1.00±0.1
	Pcox	Acyl-CoA oxidase 3, pristanoyl	1420684_at	0.18	0.75±0.0 <sup>a</sup>	0.76±0.1 <sup>a</sup>	1.00±0.0
Taranscriptional regulation	Srebp1	Sterol regulatory element binding factor 1	1426690_a_at	0.26	0.68±0.1	0.77±0.1	1.00±0.2
Growth factor and leptin	Igf-1	Insulin-like growth factor 1	1419519_at	0.19	0.63±0.1 <sup>ab</sup>	0.86±0.1	1.00±0.1
	Obese	Leptin	1422582_at	≥0.3	0.58±0.2	0.83±0.2	1.00±0.1

平均値±標準偏差

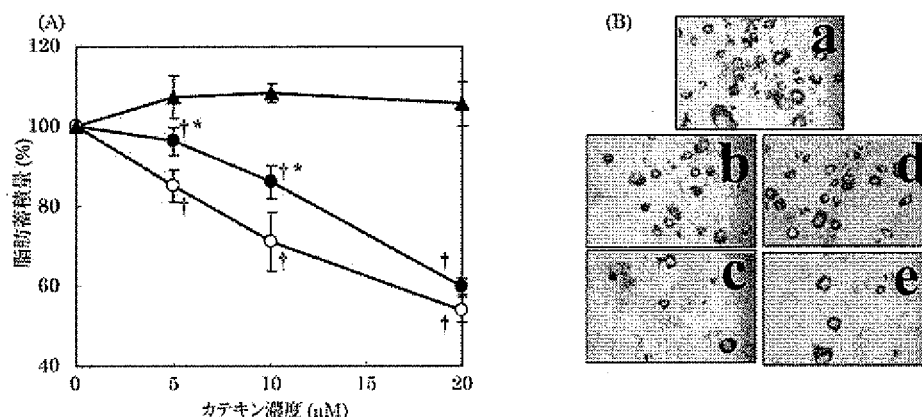
<sup>a</sup>; 多重比較 (Tukey の方法) において無添加群と有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた<sup>b</sup>; 多重比較 (Tukey の方法) において「やぶきた」群と有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた

図 1 カテキンによる脂肪細胞 (3T3-L1) への分化抑制作用

(A) データは平均値±標準偏差で示した。●; EGCG3<sup>Me</sup>, ○; EGCG, ▲; カフェイン。†; 多重比較 (Tukey の方法) においてカフェイン処理区と有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。\*; 多重比較において EGCG 処理区と有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。

(B) 脂肪細胞 (3T3-L1) の Oil Red O 染色像。

a; カテキン未処理, b; 10 μM EGCG 処理, c; 20 μM EGCG 処理, d; 10 μM EGCG3<sup>Me</sup> 処理, e; 20 μM EGCG3<sup>Me</sup> 処理。

その他, 前駆脂肪細胞の分化を促進する Insulin like growth factor-1 (IGF-1) 遺伝子<sup>17)</sup> の発現量は, 「べにふうき」群が「やぶきた」群および無添加群と比較して有意に減少していた。レプチン遺伝子の発現量は, 各群間に有意差を認めるには至らなかったものの, 「べにふうき」群が無添加群の 0.58 倍と低値を示し, 体脂肪率と正の相関関係にあるとされる血中レプチン濃度<sup>18)19)</sup> の挙動 (表 1) とよく一致していた。

## 2. EGCG および EGCG3<sup>Me</sup> の脂肪蓄積抑制効果

3T3-L1 細胞の脂肪蓄積に及ぼす EGCG および EGCG3<sup>Me</sup> の抑制作用を, カフェインを対照として比較した。培地中へ添加した EGCG および EGCG3<sup>Me</sup> の濃度は, 予備試験により 3T3-L1 細胞に対する細胞毒性が認められなかった 0-30 μM の範囲とした (データ省略)。分化誘導開始時より 3T3-L1 を異なる濃度 (5, 10, 20 μM) の EGCG, EGCG3<sup>Me</sup> あるいはカフェインを添加した培地で 8 日間培養し, 細胞内の脂肪蓄積量を Oil Red O 染色により測定した。その結果, カフェイン添加と EGCG 添加との間, およ

び, カフェイン添加と EGCG3<sup>Me</sup> 添加との間には, いずれも脂肪蓄積量に有意差が認められ, EGCG と EGCG3<sup>Me</sup> のいずれについても濃度依存的な脂肪蓄積抑制作用が認められた (図 1A)。Oil Red O 染色後の顕微鏡観察の結果からも, EGCG と EGCG3<sup>Me</sup> は共に細胞内の脂肪蓄積量を濃度依存的に減少させることが確認された (図 1B)。一方, カフェインには脂肪蓄積抑制効果は認められなかった (図 1A)。

しかし, 上で見られた EGCG と EGCG3<sup>Me</sup> による脂肪蓄積抑制効果は, 3T3-L1 細胞の分化が抑制された結果の可能性も考えられる。そこで, 脂肪蓄積量の比較ではなく, 脂肪を蓄積した成熟脂肪細胞と脂肪を蓄積しなかった前駆細胞との比率を比較した。細胞播種後 3 日目より 3T3-L1 を異なる濃度 (5, 10, 15, 20, 30 μM) の EGCG または EGCG3<sup>Me</sup> を添加した培地で 9 日間培養し, 細胞に蓄積した脂肪を蛍光色素 Nile Red で染色した後, フローサイトメーターにより細胞の蛍光強度を測定して全細胞数に対する脂肪蓄積細胞数の割合 (分化率) を求めた。その結果,

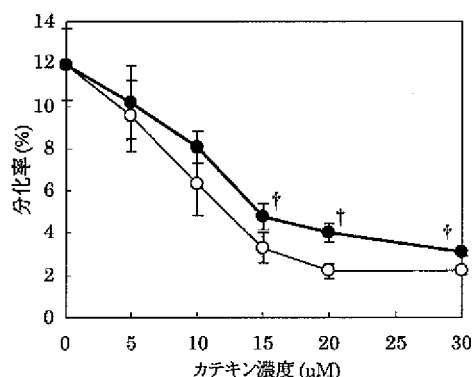


図2 カテキンによる脂肪細胞(3T3-L1)分化抑制効果  
フローサイトメトリーにより測定した分化率を示した。  
データは平均値±標準偏差で示した。●; EGCG3-Me,  
○; EGCG。†;  $p < 0.05$

無添加における分化率は12%であったのに対し、EGCGおよびEGCG3-Meを10μM添加したときにはそれぞれ6.3%および8.1%, また30μM添加ではそれぞれ2.2%および3.1%であった(図2)。これらの結果は、EGCGおよびEGCG3-Meの脂肪蓄積抑制効果は脂肪細胞の分化抑制によることを示している。EGCGおよびEGCG3-Meによる3T3-L1細胞の分化抑制は濃度依存性であり、30μM添加時のEGCG3-Meの分化抑制作用はEGCGの81.7%に比べて74.2%とほぼ同等であった。

### 3. 「べにふうき」エキスを投与したラット血漿中のEGCGおよびEGCG3-Me濃度

頭静脈カニューレラットに「べにふうき」エキスを経口投与後、血漿中のEGCGおよびEGCG3-Me濃度を経時的に測定し、AUCに変換した。「べにふうき」エキスを投与後3時間までのAUCは、EGCGの0.015μM・hに対してEGCG3-Meでは0.011μM・hであり、両者間に有意な差は認められなかった(表3)。投与した「べにふうき」エキス溶液中のEGCGおよびEGCG3-Meの濃度はそれぞれ1.00mMおよび0.23mMであったにもかかわらず、AUCで比較した血漿中のEGCG3-Me滞留量はEGCGの滞留量と遜色がないレベル(約70%)を示した(図2)。血漿をβ-グルクロニダーゼ(EC 3.2.1.31; Sigma)およびカテコール-O-サルファターゼ(EC 3.1.6.1; Sigma)で脱抱合処理しても同様の結果が得られた(データ省略)。これらの結果は、吸収率を含めた血液中での滞留性は、EGCG3-MeがEGCGの約3.2倍高いことを示している(表3)。

### 考 察

無添加の高脂肪飼料ならびに2% (w/w) の「べにふうき」茶葉または「やぶきた」茶葉を添加した高脂肪飼料によりC57BL/6Jマウスを5週間飼育し、飼育期間中における体重増加量および脂肪組織の増加重量を比較した結果、

表3 EGCGおよびEGCG3-Meの血中滞留効率

	「べにふうき」エキス中 濃度 (mM)	AUC (0-3h) (μMh)	EGCG に対する 血中量 (相対値)
EGCG	1.00	0.015	1.0
EGCG3-Me	0.23	0.011	3.2

「べにふうき」茶葉には「やぶきた」茶葉と比べて明らかに高い抗肥満効果が認められた(表1)。これらのマウスの腎周囲白色脂肪における脂質代謝関連遺伝子群の発現量をDNAマイクロアレイ解析により比較した結果、「べにふうき」茶葉の抗肥満効果は、脂肪組織における脂質合成酵素群および脂質代謝酵素群の遺伝子発現を低下させることに基づく脂肪蓄積の抑制によることが示唆された(表2)。すなわち、白色脂肪組織中の脂肪酸合成酵素遺伝子群の発現を制御しているSrebp1遺伝子<sup>14)</sup>の発現量は、「べにふうき」添加群が無添加群に比べて減少傾向にあり、Srebp1に制御されるScd2遺伝子<sup>14)</sup>の発現も50%減少していた(表2)。また、脂肪酸のβ酸化に関与するAcaa1<sup>15)</sup>やPcox遺伝子<sup>16)</sup>の発現が有意に低下していた(表2)。これは、「べにふうき」の摂取が脂肪燃焼を促進することにより抗肥満効果が現れたのではなく、脂肪蓄積の抑制によって抗肥満効果を現したことを裏付ける結果であり、培養脂肪細胞を用いたメチル化カテキンの脂肪蓄積抑制実験の結果と一致していた。さらに、肝臓および白色脂肪組織に発現している細胞成長因子insulin-like growth factor (IGF-1)は脂肪細胞の分化を促進することが知られている<sup>17)</sup>が、「べにふうき」群ではIGF-1遺伝子の発現量が無添加群に比べて有意に低下しており(表2)、脂肪細胞のオートクリンなIGF-1による分化誘導を「べにふうき」が抑制する可能性が示唆された。また、レプチン遺伝子の発現量については、「べにふうき」群は無添加群に比べて0.58倍の低値を示し(表2)、体脂肪率と正の相関関係にあるとされる血中レプチン濃度<sup>18)19)</sup>の挙動(表1)とよく一致していた。DNAマイクロアレイ解析で「べにふうき」について観察されたこれらの効果は、「やぶきた」ではほとんど観察されず、Pcox遺伝子の発現が有意に低下したのみであり(表2)、「べにふうき」の抗肥満効果が「やぶきた」より強いこと(表1)とよく一致した。

Wolframらは、C57BL/6Jマウスに緑茶を長期間摂取させることにより白色脂肪細胞における脂質合成酵素(Fatty acid synthaseやStearoyl CoA desaturase 1など)の遺伝子発現が抑制され、脂肪前駆細胞にEGCGが直接作用して脂肪蓄積を抑制したと報告している<sup>20)</sup>。「べにふうき」茶葉の脂肪蓄積抑制効果が一般的な茶品種「やぶきた」に比べて強い原因は、「べにふうき」茶葉に特異的に含まれるEGCG3-Meなどのメチル化カテキンにあるという可能性が示唆されている<sup>21)</sup>。そこで我々は、マウス白色脂肪前駆



細胞3T3-L1を用いてEGCG3<sup>o</sup>Meの脂肪蓄積抑制効果をEGCGと比較した結果、メチル化カテキンはEGCGとはほぼ同等の濃度依存的な脂肪蓄積抑制作用を有することが明らかとなった(図1Aおよび図1B)。一方、カフェインには脂肪蓄積抑制効果は認められなかった(図1A)。また、DNAマイクロアレイ解析の結果からIGF-1を介する脂肪細胞の分化抑制の可能性が示唆されたので、脂肪前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化率に及ぼすEGCGおよびEGCG3<sup>o</sup>Meの影響を調べた。その結果、EGCGおよびEGCG3<sup>o</sup>Meによる脂肪蓄積抑制の作用機序は、一細胞当たりの脂肪蓄積量を均等に減少させるのではなく、脂肪細胞の分化を抑制して脂肪を蓄積する細胞数を減らすことによると考えられた。EGCGおよびEGCG3<sup>o</sup>Meによる3T3-L1細胞の分化抑制は濃度依存的であり、30  $\mu$ M添加時のEGCG3<sup>o</sup>Meの分化抑制効果はEGCGの91%であり、ほぼ同等であった(図2)。EGCGによる脂肪蓄積抑制の作用点としては、PPAR $\gamma$ <sup>11)</sup>およびC/EBP $\alpha$ <sup>11)</sup>の遺伝子発現抑制やInsulin Receptor Substrate (IRS)のリン酸化阻害<sup>20)</sup>が報告されている。我々のDNAマイクロアレイ解析の結果は、「べにふうき」に特異的に含まれるメチル化カテキンによるIGF-1遺伝子の発現抑制が脂肪蓄積抑制の作用機序に含まれる可能性を示唆しているが、3T3-L1細胞で見られた脂肪蓄積抑制効果および分化抑制効果はEGCGとEGCG3<sup>o</sup>Meで類似している(図1および図2)。EGCGについて既に報告されている上記の脂肪蓄積抑制作用機序はEGCG3<sup>o</sup>Meについてもあてはまる可能性があり、更に詳細な検討が必要である。

高脂肪飼料へ添加した「べにふうき」茶葉と「やぶきた」茶葉の非メチル化カテキン含量は同等であるが、「べにふうき」茶葉中には非メチル化カテキンの約15%のメチル化カテキンが加算的に含まれており、総カテキン含量は「べにふうき」茶葉添加飼料が「やぶきた」茶葉添加飼料より15%多かった。しかし、「べにふうき」茶葉が「やぶきた」茶葉より強い抗肥満効果を発揮する(表1)原因がこの15%相当のメチル化カテキンにあるならば、EGCG3<sup>o</sup>MeはEGCGに比べて格段に強い抗肥満効果を持たなければ説明がつかない。EGCG3<sup>o</sup>Meは、EGCGよりもヒスタミン遊離抑制作用が強く、優れた抗アレルギー作用を発揮することが知られている<sup>21)</sup>。佐野らは、EGCG3<sup>o</sup>Meの抗アレルギー作用がEGCGより強い理由として、マウス血中におけるEGCG3<sup>o</sup>Meの安定性がEGCGより高いことを挙げており、EGCG3<sup>o</sup>Meの血中滞留性はEGCGの約9倍高く、ガロイル基のトリオール構造の有無が血中安定性に大きく関与していることを報告している<sup>22)</sup>。我々は、ラットに「べにふうき」エキスを経口投与したあと、血中のEGCG3<sup>o</sup>MeとEGCGの濃度を経時的に測定し、佐野らの結果を支持する確認データを得た(図3)。すなわち、投与後3時間までのAUCで比較したとき、EGCG3<sup>o</sup>Meの血中滞留性

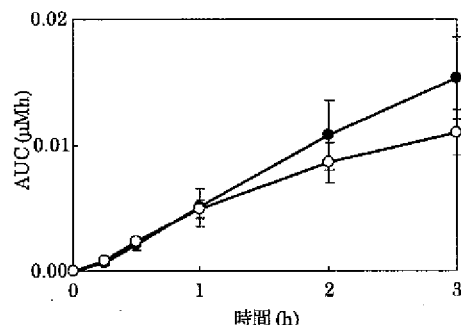


図3 「べにふうき」エキスを経口投与時のラット血漿中カテキン滞留量

データは平均値±標準誤差で示した。○; EGCG3<sup>o</sup>Me, ●; EGCG.

はEGCGの3.2倍であった(表3)。EGCG3<sup>o</sup>Meの脂肪細胞分化抑制効果は、EGCGとほぼ同等であり(図2)、EGCG3<sup>o</sup>Meの血中滞留性はEGCGに比較して3.2倍高いことを考慮すると、「べにふうき」エキスを摂取したときのEGCGとEGCG3<sup>o</sup>Meを合わせた血中滞留量はEGCGの1.7倍に(表3)に達する。これらの結果は、「べにふうき」に特異的に含まれるEGCG3<sup>o</sup>Meなどのメチル化カテキンはEGCGを含めた総カテキンの血中有効濃度を持続的に高く維持することに大きく寄与することを示しており、このことが、「べにふうき」が一般の茶品種「やぶきた」に比べて強い抗肥満効果を示す主な理由と考えられる。

## 要 約

「べにふうき」はエピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート(EGCG3<sup>o</sup>Me)等のメチル化カテキンを含有する独特な茶品種である。本報告では、「べにふうき」の強い抗肥満効果の作用機作について、メチル化カテキンを含まない茶品種「やぶきた」を比較対照として検討した。

【方法】 12週齢のC57BL/6Jマウスを高脂肪飼料のみ、2%「べにふうき」茶葉を含有する高脂肪飼料、および、2%「やぶきた」茶葉を含有する飼料により5週間飼育し、腎周囲脂肪組織中の遺伝子発現量をDNAマイクロアレイ法により網羅的に測定、比較した。また、3T3-L1細胞株を用いて、EGCG、EGCG3<sup>o</sup>Meおよびカフェインが細胞内脂肪蓄積および前駆細胞から成熟脂肪細胞への分化に及ぼす阻害効果を比較した。更に、一夜絶食させたラットに「べにふうき」の熱水抽出液を経口投与したあと、血漿中におけるEGCGおよびEGCG3<sup>o</sup>Meの経時的な濃度変化を比較した。

【結果および結論】 DNAマイクロアレイの結果より、「べにふうき」の抗肥満効果は、脂肪細胞中における脂肪酸の合成および $\beta$ 酸化に関連する酵素群の遺伝子発現レベルを低下させることにより、細胞内への脂肪蓄積を阻害した

結果であると考えられた。「べにふうき」が「やぶきた」よりも強い抗肥満効果を有する主な原因は、「べにふうき」に含まれるメチル化カテキン（主として EGCG3-Me）にあると考えられた。EGCG3-Me の脂肪蓄積阻害効果は EGCG とほぼ同等であり（3T3-L1 細胞の分化抑制効果として約 91%）、血中における滞留性は EGCG の 3.2 倍高いため、「べにふうき」中に含まれる EGCG3-Me 量は EGCG 量に比べて非常に少ないにもかかわらず、EGCG と EGCG3-Me を合算した脂肪蓄積抑制効果は EGCG 単独の効果に比べて 1.7 倍高くなり、EGCG3-Me が含まれることによって「べにふうき」の抗肥満作用は増強されている。

カテキン精製に御協力いただきました静岡県立大学薬学部薬学科、宮瀬 敏男教授に篤く御礼申し上げます。

### 文 献

- 山本(前田)万里, 佐藤満昭, 松田奈帆美, 宮瀬敏男, 川本恵子, 鈴木直子, 吉村昌恭, 立花宏文, 袴田勝弘, 茶の品種, 摘採期と製造法によるエピガロカテキン 3-O-(3-O-メチル) ガレート含量の変動, 食科工, 48, 64-68 (2001).
- Suzuki, M., Sano, M., Yoshida, R., Degawa, M., Miyase, T. and Maeda-Yamamoto, M., Epimerization of tea catechins and O-methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate: relationship between epimerization and chemical structure. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 510-514 (2003).
- Meguro, S., Mizuno, T., Onizawa, K., Kawasaki, K., Nakagiri, H., Komine, Y., Suzuki, S., Matsui, Y., Hase, T., Tokimitsu, I., Shimasaki, H. and Itakura, H., Effects of Tea Catechins on Diet-induced Obesity in Mice. *J. Oleo Science*, 50, 593-598 (2001).
- Hase, T., Komine, Y., Meguro, S., Takeda, Y., Takahashi, H., Mtsui, Y., Inaoka, S., Katsuragi, Y., Tokimitsu, I., Shimasaki, H. and Itakura, H., Anti-obesity Effects of Tea Catechins in Humans. *J. Oleo Science*, 50, 599-605 (2001).
- Wolfram, S., Raederstorff, D., Wang, Y., Teixeira, S.R., Elste, V. and Weber, P., TEAVIGO (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. *Ann. Nutr. Metab.*, 49, 54-63 (2005).
- Dulloo, A.G., Seydoux, J., Girardier, L., Chantre, P. and Vandermander, J., Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 24, 252-258 (2000).
- 稲垣ら: 食科工投稿中
- Matsui, N., Ito, R., Nishimura, E., Yoshikawa, M., Kato, M., Kamei, M., Shibata, H., Matsumoto, I., Abe, K. and Hashizume, S., Ingested cocoa can prevent high-fat diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism. *Nutrition*, 5, 594-601 (2005).
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y., Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Stat. Soc. B.*, 57, 289-300 (1995).
- Sano, M., Suzuki, M., Miyase, T., Kyoji, Y. and Maeda-Yamamoto, M., Novel Antiallergic Catechin Derivatives Isolated from Oolong Tea. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1906-1910 (1999).
- Furuyashiki, T., Nagayasu, H., Aoki, Y., Bessho, H., Hashimoto, T., Kanazawa, K. and Ashida, H., Tea Catechin Suppresses Adipocyte Differentiation Accompanied by Down-regulation of PPAR $\gamma$ 2 and C/EBP $\alpha$  in 3T3-L1 Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 2353-2359 (2004).
- Awonusonu, F., Srinivasan, S., Strange, J., Al-Jumaily, W. and Bruce, M.C., Developmental shift in the relative percentages of lung fibroblast subsets: role of apoptosis postseptation. *American J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 277, L848-859 (1999).
- Lee, M.J., Wang, Z.Y., Li, H., Chen, L., Sun, Y., Gobbo, S., Balentine, D.A. and Yang, C.S., Analysis of Plasma and Urinary Tea Polyphenols in Human Subjects. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prev.*, 4, 393-399 (1995).
- Tabor, D.E., Kim, J.B., Spiegelman, B.M. and Edwards, P. A., Identification of Conserved cis-Elements and Transcription Factors Required for Sterol-regulated Transcription of Stearoyl-CoA Desaturase 1 and 2. *J. Biol. Chem.*, 274, 20603-20610 (1999).
- Chevillard, G., Clémencet, M.C., Etienne, P., Martin, P., Pineau, T., Latruffe, N. and Nicolas-Frances, V., Molecular cloning, gene structure and expression profile of two mouse peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase genes. *BMC Biochem.*, 25, 3 (2004).
- Van Veldhoven P.P., Vanhove, G., Vanhoutte, F., Dacremont, G., Parmentier, G., Eyssen, H.J. and Mannaerts, G. P., Identification and purification of a peroxisomal branched chain fatty acyl-CoA oxidase. *J. Biol. Chem.*, 266, 24675-24683 (1991).
- Martina, A.P., Winterhalter, K.H., Boni-Schnetzler, M., Froesch, E.R. and Zapf, J., Expression of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) and IGF-Binding Proteins during Adipogenesis. *Endocrinology*, 133, 2624-2631 (1993).
- Ahren, B., Plasma leptin and insulin in C57BL/6J mice on a high-fat diet relation to subsequent changes in body weight. *Acta. Physiol. Scand.*, 165, 233-240 (1999).
- Shimizu, H., Shimomura, Y., Hayashi, R., Ohtani, K., Sato, N., Futawatari, T. and Mori, M., Serum leptin concentration is associated with total body fat mass, but not abdominal fat distribution. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 21, 536-541 (1997).
- Wolfram, S., Raederstorff, D., Preller, M., Wang, Y., Teixeira, S.R., Riegger, C. and Weber, P., Epigallocatechin Gallate Supplementation Alleviates Diabetes in Rodents. *J. Nutr.*, 136, 2512-2518 (2006).
- Maeda-Yamamoto, M., Inagaki, N., Kitaura, J., Chikamoto, T., Kawahara, H., Kawakami, Y., Sano, M., Miyase, T., Tachibana, H., Nagai, H. and Kawakami, T., O-methylated catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells. *J. Immunol.*, 172, 4486-4492 (2004).
- 佐野満昭, 宮瀬敏男, 立花宏文, 山本万里, 茶成分の抗アレルギー作用, *Fragrance J.*, 4, 46-52 (2000).

(平成 20 年 11 月 18 日受付, 平成 21 年 2 月 4 日受理)

## 茶の品種、摘採期と製造法によるエピガロカテキン 3-O-(3-O-メチル) ガレート含量の変動

山本(前田)万里\*・佐野満昭\*\*・松田奈帆美\*\*\*

宮瀬敏男\*\*・川本恵子\*\*\*・鈴木直子\*\*\*

吉村昌恭\*\*\*・立花宏文\*\*\*\*・袴田勝弘\*

### The Change of Epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl) gallate Content in Tea of Different Varieties, Tea Seasons of Crop and Processing Method

Mari MAEDA-YAMAMOTO\*, Mitsuaki SANO\*\*, Nahomi MATSUDA\*\*\*, Toshio MIYASE\*\*,  
Keiko KAWAMOTO\*\*\*, Naoko SUZUKI\*\*\*, Masayasu YOSHIMURA\*\*\*,  
Hirofumi TACHIBANA\*\*\*\* and Katsuhiko HAKAMATA\*

\* National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, MAFF, 2769 Kanaya,  
Shizuoka 428-8501

\*\* School of Pharmaceutical Science, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526

\*\*\* Bio-oriented Research Advanced Institution, Kanaya, Shizuoka 428-8501

\*\*\*\* Division of Bioresources and Bioenvironmental Science, Kyushu University, 6-10-1  
Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

The content of epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl) gallate (EGCG3"Me), which has been observed an anti-allergic action *in vitro* and *in vivo* (mouse) and present in tea leaves, was determined in different tea varieties, at different cropping seasons and upon various processing methods. Benihomare and two of its offsprings, Benifuuki and Benifuji contained as much as 1% of EGCG3"Me in their green teas and slightly less in their semi-fermented teas. Surprisingly, EGCG3"Me was absent in Izumi, a third offspring of Benihomare. A higher concentration of EGCG3"Me was found on or after the second crop in Benihomare and Benifuji. Furthermore, EGCG3"Me was not detected in black tea (fermented tea) manufactured from Benihomare and Benifuji. Thus, to benefit the anti-allergic effect of EGCG3"Me, green or semi-fermented teas, made from Benihomare, Benifuuki and Benifuji at second crop onwards, should be consumed. (Received Aug. 3, 2000; Accepted Oct. 23, 2000)

茶 (*Camellia sinensis*) は、近年、抗酸化性・抗腫瘍性・抗菌作用・抗う蝕性・生活習慣病予防などの生理機能が多数解明され<sup>1)~3)</sup>、注目されてきた嗜好飲料である。特に数多くの生理機能が報告されているのが、ポリフェノール類のカテキンである。緑茶に含まれているカテキン類は10~20%で、その主要なものは、カテキン

類の約半量を占めるエピガロカテキンガレート (EGCG)、その他エピガロカテキン (EGC)、エピカテキンガレート (ECG)、エピカテキン (EC) である。紅茶ではそれらの重合したテアフラビン類、テアシネンシン類、テアルビジン類が含まれている。EGCG は、茶以外の植物では見いだされていない特殊なポリフェノールで

\* 農林水産省野菜・茶業試験場 (〒428-8501 静岡県榛原郡金谷町金谷 2769)

\*\* 静岡県立大学薬学部 (〒422-8526 静岡市谷田 52)

\*\*\* 生物系特定産業技術研究推進機構 (〒428-8501 静岡県榛原郡金谷町金谷 2769)

\*\*\*\* 九州大学大学院農学研究院 (〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1)

ある。また、筆者らは最近、抗アレルギー作用の強いエピガロカテキン-3-O-(4-O-チル) ガレート (EGCG4<sup>o</sup>Me) 及びエピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル) ガレート (EGCG3<sup>o</sup>Me) (Fig. 1) を茶葉中に見いだした<sup>3,4)</sup>。これらのメチル化カテキンは、従来抗アレルギー作用のあるといわれていた EGCG<sup>3,7)</sup> に比べさらに強い即時型アレルギー阻害効果を示した<sup>4)</sup>。本稿では、抗アレルギー作用が期待される EGCG3<sup>o</sup>Me 含量の品種及び茶期による差異、製造法による変動を検討したので報告する。

## 実験方法

### 1. 供試茶

茶葉は、野菜・茶業試験場の園場で 42 品種を 1999 年一番茶期に一心二葉で手摘みしマイクロ波乾燥した試料、同一の畑で 'べにほまれ' (茶農林 1 号), 'べにふうき' (茶農林 44 号) を 1999 年一番茶期 (5/10), 二番茶期 (5/16), 三番茶期 (7/27), 四番茶期 (秋冬番茶期) (9/17) に一心三葉で手摘みしマイクロ波にて乾燥させた試料、および一番茶期 'べにほまれ', 'べにふうき' を機械で摘採し 2 kg 機を使用して煎茶に製造した試料、1~2 時間日干萎凋した後、釜炒り機で包種茶 (弱発酵茶) に製造した試料、萎凋棚で一晩萎凋し 30% 前後重量を減少させて肉挽き機で粉碎し、発酵室で発酵させ紅茶に製造した試料をそれぞれ供試した。実験に際しては、あらかじめそれぞれの試料を粉砕機 (サイクロテック, 1 mm メッシュ) で粉碎した。

### 2. カテキン類の化学分析法

マイクロ波乾燥した茶葉粉末 25 mg を水: アセトニトリル (1:1) 5 ml で 30℃, 40 分間抽出し、遠心ろ過した上清を使用した。カテキン含量は梅垣らの方法<sup>8)</sup>に従い、TSK-gel-ODS-80Ts (4.6 mm×250 mm (東ソー製)) による液体クロマトグラフ法 (カラム温度: 30℃, 検出器: ECD (加電圧 0.6 V), 移動相: pH 2.5, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> バッファ (0.1 mM EDTA, 2 Na 含有)/アセトニトリル混液 (87:13), 流速: 1.0 ml/min, 注入量: 20 µl) にて分析した。

## 実験結果および考察

### 1. 品種による EGCG3<sup>o</sup>Me 含量の差異

EGCG3<sup>o</sup>Me 及び EGCG4<sup>o</sup>Me は、マウスを用いた PCA 法による I 型アレルギー試験<sup>9)</sup>において、従来より抗アレルギー作用があるといわれてきた EGCG<sup>3,7)</sup> に比べ有意に強い抑制作用を示すこと<sup>4)</sup>が明らかにされ

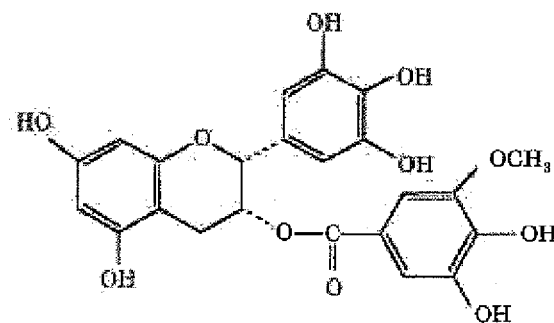


Fig. 1 Chemical structure of epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl) gallate (EGCG3<sup>o</sup>Me)

た。また、マウスマスト細胞株を使った *in vitro* の試験<sup>10)</sup>でもヒスタミン遊離を強く抑制することを明らかにし (投稿中), 抗アレルギー作用があると示唆された。そのため、抗アレルギー作用を利用した製品製造等を考える場合、これらメチル化カテキン含量の変動を検討しておく必要がある。EGCG4<sup>o</sup>Me は、現在までのところ、台湾産のウーロン茶のみに見いだされるため、本報では EGCG3<sup>o</sup>Me について、その含量の差異および変動を検討した。まず、主要な 42 品種の一番茶における EGCG3<sup>o</sup>Me の含量を Table 1 に示す。'べにほまれ' その後代である 'べにふうき', 'べにふうき' で最も高い含量を示した。しかし後代の一つである 'いずみ' ではほとんど検出されなかった。ついでに高かったのは、青心大ばん、大葉烏龍などの中国系統であった。日本で製造される緑茶のほとんどを占める品種 'やぶきた' では EGCG3<sup>o</sup>Me 含量は検出限界以下であった。このことから、抗アレルギー作用を期待した茶を製造するためには、'べにほまれ' 'べにふうき' 'べにふうき' を用いることが必要であると示唆された。

### 2. 茶期による EGCG3<sup>o</sup>Me 含量の変動

EGCG3<sup>o</sup>Me 含量の多い 'べにほまれ', 'べにふうき' について一番茶から秋冬番茶までの含量変動を調べたところ、Table 2 に示すように、二番茶以降の含量が増加した。'べにふうき' 三番茶のみ含量が若干減少し、エピ体以外のカテキン類 (ガロカテキン (GC), ガロカテキンガレート (GCG), カテキンガレート (CG)) 含量が増加したが、総カテキン量としては二番茶、秋冬番茶とほとんど変化がなかった。この原因は現在のところ不明である。茶のポリフェノール類の合成は光量、温度に依存するとされており<sup>11,12)</sup>、二番茶以降の含量増加と一致する。この結果から、EGCG3<sup>o</sup>Me を多く摂取するためには、二番茶以降の茶葉を使用する必要があると考えられ

Table 1 Catechins contents in various varieties of tea

Catechins (% of dry weight)											
No.	Varieties	GC	EGC	C	EC	EGCG	GCG	EGCG3 <sup>o</sup> Me	ECG	CG	GCG3 <sup>o</sup> Me
1	Z-1	0.193	2.169	0.386	0.919	6.583	0.573	0.331	5.311	0.107	0.036
2	Asagiri	0.341	2.933	0.550	1.133	5.408	0.370	0.135	3.491	0.123	0.025
3	Asatsuyu	0.348	2.373	0.479	1.040	5.630	0.470	ND	4.004	0.115	ND
4	Asahi	0.462	2.954	0.591	1.216	7.395	0.649	ND	5.173	0.150	ND
5	Izumi	0.790	3.409	0.584	1.151	8.678	1.588	ND	5.843	0.236	ND
6	Inzatsu 131	0.306	2.389	0.439	0.813	8.237	0.668	0.175	4.426	0.096	0.029
7	Ujihikari	0.418	2.981	0.639	1.764	6.573	0.553	0.300	6.446	0.205	0.013
8	Ooiwase	0.614	3.069	0.533	1.461	6.438	0.841	ND	3.980	0.146	ND
9	Okumidori	0.682	4.501	0.543	1.425	7.966	0.825	0.701	5.050	0.131	0.058
10	Okumusashi	0.374	3.413	1.009	1.179	8.862	0.876	0.341	5.154	0.205	0.038
11	Kanayamidori	0.480	4.757	0.733	1.565	7.538	0.497	ND	3.505	0.063	ND
12	Karabeni	0.729	5.765	1.002	1.559	8.034	0.647	0.237	3.837	0.086	0.013
13	Kuritawase	ND	2.472	0.737	1.097	8.474	1.604	0.374	5.427	0.169	0.040
14	Gokou	0.826	3.535	0.824	1.667	7.504	1.304	0.159	5.537	0.293	0.024
15	Komakage	0.603	4.108	0.762	1.883	7.959	0.834	ND	7.828	0.193	ND
16	Samidori	0.199	3.012	0.637	1.578	8.074	0.263	0.014	4.620	0.101	0.037
17	Sayamamidori	0.248	4.071	0.860	1.953	8.017	0.448	0.076	6.511	0.125	0.018
18	Sayamakaori	0.370	3.773	1.222	1.505	8.485	0.473	ND	5.933	0.150	0.025
19	Surugawase	0.452	3.902	0.593	1.458	8.660	0.589	ND	5.245	0.058	0.016
20	Okuyutaka	0.595	3.643	0.735	1.544	8.466	0.927	0.281	5.852	0.125	0.013
21	Seishin-taipan	0.545	5.612	0.499	1.330	8.646	0.268	0.547	2.935	0.024	0.009
22	Ooba-oolong	0.607	5.828	0.567	1.480	9.304	0.193	0.584	3.696	0.046	ND
23	Takachiho	0.381	4.807	0.624	2.313	8.594	0.352	ND	7.731	0.070	ND
24	Tadanishiki	0.654	4.839	0.675	1.728	9.803	0.728	ND	7.594	0.064	ND
25	Tamamidori	0.468	4.304	0.454	1.320	8.041	0.544	0.081	5.002	0.077	0.023
26	Toyoka	1.152	3.319	1.176	1.547	7.321	1.547	ND	5.660	0.275	0.016
27	Natsumidori	0.316	4.173	0.352	1.667	7.965	0.442	0.326	5.553	0.158	0.023
28	Hatsumomiji	0.916	5.115	0.598	1.825	8.406	1.015	ND	6.178	0.118	ND
29	Himemidori	0.591	4.297	0.631	1.62	7.343	0.691	0.394	4.645	0.121	0.019
30	Fujimidori	0.608	4.83	0.634	1.9	7.723	0.411	ND	4.374	0.045	ND
31	Benihikari	0.154	4.083	0.489	1.428	9.534	0.35	0.478	5.9	0.048	0.032
32	Benifuuki	0.174	3.82	0.785	2.006	10.093	0.128	1.502	7.625	0.049	0.026
33	Benifuji	0.285	4.453	0.449	1.187	10.250	0.834	1.516	4.817	0.101	0.072
34	Benihomare	0.420	6.102	0.659	1.778	8.994	0.430	1.241	5.347	0.053	0.043
35	Makinoharawase	0.394	4.184	0.624	1.941	7.766	0.470	0.145	6.853	0.169	0.022
36	Meiryoku	0.774	3.317	0.622	1.235	7.623	1.375	ND	4.372	0.143	ND
37	Yaeho	0.481	3.481	0.500	1.725	7.038	0.710	0.299	5.597	0.120	0.033
38	Yabukita	0.170	1.730	0.714	1.063	7.676	0.382	ND	3.892	0.072	ND
39	Yamakai	0.247	2.561	0.393	0.979	7.196	0.715	0.311	4.151	0.143	0.029
40	Yamatomidori	0.500	2.780	1.087	1.278	8.156	0.930	0.392	6.623	0.230	0.039
41	Yamanami	0.360	4.434	0.882	1.109	8.414	0.297	ND	4.051	0.121	0.024
42	Yutakamidori	0.666	4.711	0.983	1.667	7.241	0.698	0.133	3.842	0.077	0.013

1) GC, galliccatechin; ECG, epicatechin gallate; C, catechin; EC, epicatechin; EGCG, epigallocatechin gallate; EGCG3<sup>o</sup>Me, epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl) gallate; GCG, galliccatechin gallate; ECG, epicatechin gallate; CG, catechin gallate; GCG3<sup>o</sup>Me, galliccatechin-3-O-(3-O-methyl) gallate.

2) ND, under detection limit (<0.01%).

Table 2 Effects of tea season of crop on catechins contents in tea

Contents (% dry tea leaves)												
Samples	Tea season of crop	Date	GC	EGC	C	EC	EGCG	GCG	EGCG3"Me	ECG	CG	Total catechins
Benihomare :	1 <sup>st</sup>	5/11	0.403	4.244	0.129	1.654	5.289	0.227	0.596	2.016	0.048	14.606
	2 <sup>nd</sup>	7/1	0.349	4.748	0.140	1.355	6.598	0.554	0.704	2.740	0.041	17.229
	3 <sup>rd</sup>	7/30	0.657	4.490	0.217	1.367	5.682	0.555	0.714	2.731	0.085	16.498
	4 <sup>th</sup>	9/27	0.755	4.825	0.255	1.843	5.491	0.812	0.725	3.534	0.194	18.434
Benifuuki :	1 <sup>st</sup>	5/6	0.211	4.714	0.145	1.914	5.265	0.069	0.851	2.782	0.040	15.991
	2 <sup>nd</sup>	7/1	0.532	4.513	0.180	2.064	5.400	0.308	1.497	3.636	0.099	18.229
	3 <sup>rd</sup>	8/5	1.156	4.149	0.394	1.520	5.282	1.202	0.811	3.515	0.415	18.444
	4 <sup>th</sup>	9/27	0.678	4.618	0.249	1.670	5.512	0.603	1.299	3.718	0.150	18.497

Table 3 Changes in catechins contents after manufacturing processes (green tea, semi-fermented tea and black tea)

Samples		Catechins (% of dry weight)						
		GC	EGC	C	EC	EGCG	EGCG3"Me	ECG
Benihomare :								
	Green tea	0.24	4.58	0.18	1.11	9.74	0.58	2.02
Houshucha (semi-fermented tea)		0.22	3.52	0.21	0.90	9.20	0.47	2.27
	Black tea	0.07	0.13	0.02	0.08	0.34	ND	0.05
Benifuji :								
	Green tea	0.26	4.28	0.26	0.86	11.84	1.06	1.95
Houshucha (semi-fermented tea)		0.26	3.26	0.29	0.77	9.11	0.77	1.52
	Black tea	0.04	0.08	0.02	0.06	0.24	0.04	0.06

ND : under detection limit (&lt;0.01%).

た。  
 3. 製造法による EGCG3"Me 含量の変動  
 同じ原葉 ('べにほまれ' 及び 'べにふじ') を異なる製造法で製造した場合の EGCG3"Me 含量の変動を Table 3 に示す。紅茶のような強発酵 (酸化) を行くと、他のカテキン同様、EGCG3"Me はほぼ消失することが明らかとなった。このことから、EGCG3"Me を摂取するためには、紅茶に製造するのではなく、緑茶もしくはごく弱く発酵した茶 (包種茶など) に製造することが必要であることが示唆された。

レート (EGCG3"Me) 含量の品種、摘採期、製造法による変動を検討した。EGCG3"Me は、品種別では、'べにほまれ' およびその後代である 'べにふうき'、'べにふじ' に多く含まれ、二番茶以降に増加することがわかった。また、製造法では、緑茶 (不発酵茶)、包種茶 (軽発酵茶) では大きな差異はなかったが、紅茶 (発酵茶) にすると消失した。これらにより、EGCG3"Me を活用するためには、'べにほまれ'、'べにふうき'、'べにふじ' の二番茶以降の茶葉を使用し、緑茶もしくは包種茶に製造する必要があることが示唆された。

## 要 約

本稿では、茶葉中の抗アレルギー作用が期待されるカテキンであるエピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル) ガ

本研究は、生物系特定産業技術研究推進機構基礎研究推進事業の補助の一部を受けて行った。また、本研究を行うにあたり、試料の採取、抗アレルギー活性評価を協

力していただいた野菜・茶業試験場の小谷洋氏、山口貴哉氏、入部憲太氏に深く感謝の意を表したい。

### 文 献

- 1) 山本(前田)万里: 茶の体調調節機能, 食科工, 43, 653 (1996).
- 2) 山本(前田)万里: 食品工業, 41, 50 (1998).
- 3) 山本(前田)万里・佐野満昭・立花宏文: バイオサイエンスとインダストリー, 57, 41 (1999).
- 4) SANO, M., SUZUKI, M., MIYASE, T., YOSHINO, K. and MAEDA-YAMAMOTO, M.: *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1906 (1999).
- 5) 大須博文・竹尾忠一・杉山 清・横田正美: *Fragrance Journal*, 11, 50 (1990).
- 6) 山田耕路: 食科工, 42, 952 (1995).
- 7) MATSUO, N., YAMADA, K., SHOJI, K., MORI, M. and SUGANO, M.: *Allergy*, 52, 58 (1997).
- 8) 梅垣敏三・江差隆年・手塚雅勝・小野明子・佐野満昭・富田 勲: 食衛誌, 37, 77 (1996).
- 9) KATAOKA, H., TSUDA, A., TSUDA, Y., BABA, A., YOSHIDA, H., HIRASAWA, R., TOBIMATSU, NISHIGUCHI, M., SEMMA, M. and ITO, Y.: *Chem. Pharm. Bull.*, 20, 714 (1997).
- 10) MAEDA-YAMAMOTO, M., KAWAHARA, H., MATSUDA, N., NESUMI, K., SANO, M., TSUJI, K., KAWAKAMI, Y. and KAWAKAMI, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 2277 (1998).
- 11) SAJIO, R.: *Plant Cell Physiol.*, 21, 989 (1980).
- 12) IWASA, K.: 茶業試験場研究報告 (English), 13, 101 (1977).

(平成12年8月3日受付, 平成12年10月23日受理)

## Partial Translation of Reference Documents 1 and 2

## [Reference Document 1]

Table 1. Body weight, diet amount, organ weight and serum biochemical data in each group

	"Benifuki" group	"Yabukita" group	Additive-free group
Body weight increase (g/5 weeks)	6.00±0.67 <sup>†</sup>	7.53±0.70	8.79±0.87
Total ingested calorie (kcal/5 weeks)	556.8±13.6	575.6±17.2	568.2±20.9
Liver (mg)	1019.5±20.3	1019.6±32.7	1100.8±29.8
Subcutaneous fat (mg)	450.1±41.1 <sup>†</sup>	556.3±50.8 <sup>†</sup>	765.7±77.7
Epididymal fat (mg)	861.1±93.1 <sup>†</sup>	1035.8±114.7	1308.2±149.1
Perirenal fat (mg)	273.4±35.0 <sup>†</sup>	337.6±32.0	462.2±55.1
Blood total cholesterol (mg/dL)	155.8±4.8	138.9±10.2	161.8±4.9
Blood neutral fat (mg/dL)	50.0±6.31	61.2±6.13	61.5±8.15
Blood sugar (mg/dL)	220.1±7.8	240.5±7.5	250.3±10.9
Blood leptin (ng/mL)	1.56±0.34 <sup>†</sup>	3.11±0.99	5.32±1.40

Mean value ± standard deviation

<sup>†</sup>: In the multiple comparison (Tukey method), a significant difference ( $p < 0.05$ ) from the additive-free group was recognized.

## [Portion A : page 412-413 ]

It is known that tea catechins contained in green teas include a group of analogues such as epigallo catechin gallate (EGCG), epigallo catechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), and epicatechin (EC), and that, among them, EGCG is highest in content and generally the strongest in physiological activity. Although the tea catechin composition in green teas varies depending on the plant variety, cultivation conditions, leave-picking time, processing conditions and so on, dried tea leaves of "Benifuki", one tea variety, contains a methylated catechin represented by epigallo catechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate (EGCG3"Me) at about 0.8 to 2.5% (w/w) (the proportion of methylated catechin in the total catechins is about 15% by weight). This methylated catechin is not contained in "Yabukita", one of the generally distributed tea varieties within Japan.

Recently, obesity has been recognized as a social problem, and much attention has been focused on countermeasures against it such as the introduction in April 2008 of specific health examination and specific health guidance. Hitherto, although it has been reported that the green tea and tea catechins including EGCG have anti-obesity activity such as fat accumulation suppressive action <sup>3)</sup> to <sup>5)</sup> and energy metabolism-stimulating action <sup>6)</sup>, there has been no report on the anti-obesity effect of "Benifuki" and EGCG3"Me". We have found that "Benifuki" tea leaves have a strong anti-obesity action compared to "Yabukita" tea leaves <sup>7)</sup>.

## [Portion B : page 67]

## 1. DNA microarray analysis

As a result of allowing 12 weeks-old male C57BL/6J mice free access to a 2% "Benifuki" tea leave-supplemented high fat diet, a 2% "Yabukita" tea leave-supplemented high fat diet and an additive-free high fat diet (each group,  $n = 10$ ) followed by measuring the obesity-related parameter(s), "Benifuki" tea leaves exhibited stronger anti-obesity effects than "Yabukita" tea leaves, which are commonly used as tea leaves (Table 1).

## [Reference Document 2]

## [Portion C]



### 3. Variations in EGCG3"Me content owing to manufacturing methods

Table 3 shows variations in EGCG3"Me content when the same original tea leaves ('Benihomare' and 'Benifuji') were processed with different methods. It became clear that, when the strong fermentation (oxidation) is performed as in the case of black tea, EGCG3"Me almost disappeared similarly as in the case of other catechins. These results suggest that, in order to ingest EGCG3"Me, it is necessary to manufacture green tea or an extremely weakly fermented tea (such as Pouchong tea).